ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2015, 1 (98), 16 – 34

DOI: 10.15193/zntj/2015/98/002

JAGODA MAJCHERCZYK, KRZYSZTOF SURÓWKA

HETEROCYKLICZNE AMINY AROMATYCZNE JAKO ZAGROŻENIE CHEMICZNE W PRODUKTACH MIĘSNYCH PODDAWANYCH OBRÓBCE TERMICZNEJ

S t r e s z c z e n i e

Niektóre sposoby przetwarzania żywności mogą powodować powstawanie w niej szkodliwych związków chemicznych, w tym mutagennych i kancerogennych heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA). Substancje te tworzą się podczas obróbki termicznej produktów o dużej zawartości białka, przy czym ich ilość i rodzaj są warunkowane głównie temperaturą, czasem i rodzajem tego procesu. W niniejszej pracy przedstawiono ogólną charakterystykę oraz podział HCA, z uwzględnieniem ich budowy chemicznej i warunków powstawania. Omówiono również metody obróbki termicznej mięsa pod względem tworzenia się heterocyklicznych amin aromatycznych oraz hamowania procesów ich powstawania. Istnieje bowiem związek pomiędzy częstym spożywaniem przetworzonego mięsa a częstotliwością występowania nowotworów u ludzi. Ostatnia cześć pracy stanowi przegląd technik analitycznych oczyszczania i ekstrakcji próbek zawierających wymienione związki, a także metod ich analizy jakościowej i ilościowej.

Słowa kluczowe: heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA), obróbka termiczna żywności, przetwory mięsne, związki mutagenne, związki kancerogenne

Wprowadzenie

Dane epidemiologiczne wskazują na wyraźny związek pomiędzy niektórymi składnikami żywności a występowaniem określonych chorób, np. nowotworowych [4]. Do najbardziej szkodliwych związków wyizolowanych z artykułów spożywczych należą m.in. heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), nitrozoaminy oraz niektóre produkty reakcji Maillarda [1, 34, 41]. Związki te mogą powstawać podczas przygotowywania żywności bądź jej przechowywania. Heterocykliczne aminy aromatyczne, będące przedmiotem tej pracy,

Dr J. Majcherczyk, prof. dr hab. inż. K. Surówka, Katedra Chłodnictwa i Koncentratów Spożywczych, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie. ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: jmajcherczyk@ar.krakow.pl

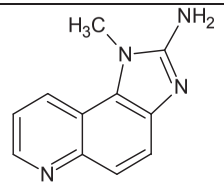
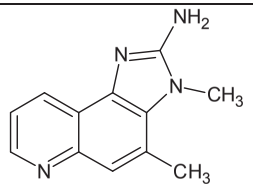
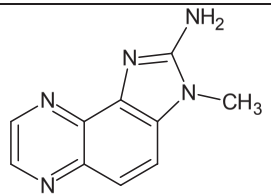
należą do najbardziej mutagennych i najprawdopodobniej kancerogennych związków chemicznych powstających w produktach spożywczych podczas obróbki termicznej. Ich występowanie stwierdzono również w dymie tytoniowym i spalinach samochodowych. W żywności zostały wykryte po raz pierwszy w latach 70. XX wieku, a ich mutagenność potwierdzono dwie dekady później [32]. Obecnie w przetworzonej żywności wysokobiałkowej zidentyfikowano ponad dwadzieścia pięć różnych heterocyklicznych amin aromatycznych. Dziewięć z nich Międzynarodowa Agencja Badania Raka (ang. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) zaklasyfikowała jako substancje możliwie rakotwórcze dla człowieka (grupa 2B), są to: MeIQ, MeIQx, PhIP (polarne) oraz AαC, MeAαC, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2 (niepolarne), natomiast związek IQ – jako substancję prawdopodobnie rakotwórczą (grupa 2A) [19, 39, 49]. W związku z powyższym wydano zalecenie ograniczenia ich spożycia. W 2004 r. związki IQ, MeIQ, 8-MeIQx oraz PhIP zostały wyszczególnione w Narodowym Programie Toksykologicznym (ang. *National Toxicology Program*) w USA [35] jako substancje rakotwórcze dla ludzi. Brak jest innych regulacji prawnych na temat dopuszczalnych zawartości HCA w żywności.

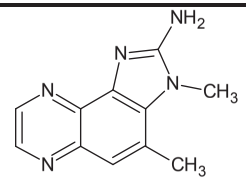
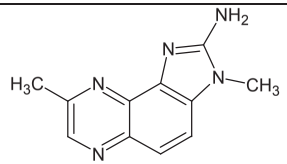
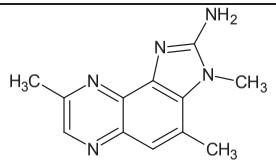
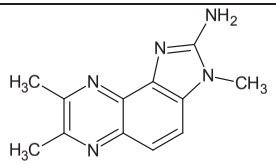
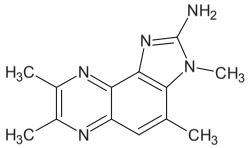
Charakterystyka chemiczna HCA

Heterocykliczne aminy aromatyczne należą do grupy związków zbudowanych z układów pierścieniowych, w skład których wchodzą atomy azotu oraz przyłączone do nich wolne grupy aminowe. Do ww. grupy związków zalicza się również 1-metylo-9H-pirydo[4,3-b]indol (harman) oraz 9H-pirydo[4,3-b]indol (norharman), pomimo że nie zawierają wolnych grup aminowych [5, 6]. Z żywności poddawanej obróbce termicznej wyizolowano i zidentyfikowano ponad dwadzieścia pięć tego typu związków, przy czym wiele z nich może dodatkowo występować w postaci izomerów różniących się liczbą i położeniem grup metylowych. W tab. 1. zamieszczono wzory strukturalne oraz podstawowe właściwości fizykochemiczne najczęściej występujących HCA wraz ze skrótami ich nazw systematycznych.

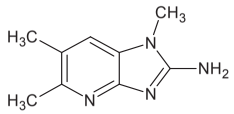
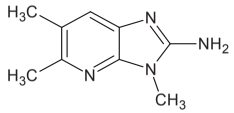
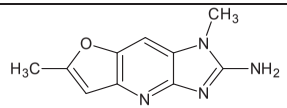
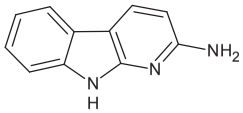
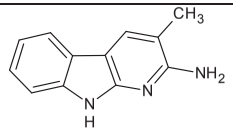
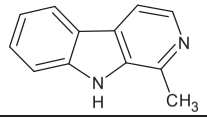
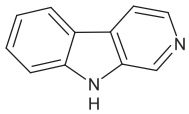
Oznaczane aminy można podzielić ze względu na ich polarność [33]. Do grupy polarnych heterocyklicznych amin aromatycznych zalicza się amino-imidazo-azareny (tzw. grupa „IQ"). Związki te powstają podczas przygotowywania potraw w zakresie temperatury 100 ÷ 300 ºC (gotowanie, pieczenie, wędzenie), dlatego nazywa się je również aminami termicznymi. Wszystkie aminy należące do tej klasy w swojej strukturze zawierają fragment 2-amino-N-metyloimidazolu. Ten ostatni pochodzi od kreatyniny i w wyniku reakcji Maillarda przyłącza się do chinoliny, w wyniku czego powstają: IQ i MeIQ, chinoksaliny – IQx, MeIQx, DiMeIQx i TriMeIQx lub pirydyny – PhIP, 4'-OH-PhIP, DMIP i TMIP [13].

Tabela 1. Wzory strukturalne i podstawowe właściwości heterocyklicznych amin aromatycznych
Table 1. Structural formulas and basic properties of heterocyclic aromatic amines

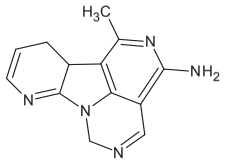
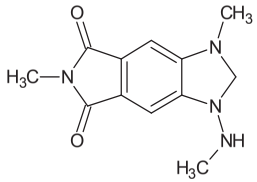
Nazwa systematyczna Systematic name	Skrót Abbreviation	Wzór strukturalny Structure	Masa molowa Molecular mass	Temp. topnienia [°C] Melting point [°C]	pKa	Rok odkrycia Year when discov-ered
Aminy polarne Polar amines						
2-amino-3 metyloimidazo[4,5-f]chinolina 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]-quinoline	IQ		198,2	>300	3,8	1980
2-amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]chinolina 2-amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]-quinoline	MeIQ		212,3	298	6,4	1980
2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinoksalina 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline	IQx		199,3	295	6,25	1988

2-amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina 2-amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline	4-MeIQx		213,3	295	6,25	1987
2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina 2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline	8-MeIQx		213,3	295	5,95	1981
2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina 2-amino-3,4,8-trimethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline	4,8-DiMeIQx		227,3	>300	5,8	1985
2-amino-3,7,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina 2-amino-3,7,8-trimethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline	7,8-DiMeIQx		227,3	>300	6,5	1984
2-amino-3,4,7,8-tetrametyloimidazo[4,5-f]chinoksalina 2-amino-3,4,7,8-tetramethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline	TriMeIQx		241,3	b.d. nda	6,0	1992

2-amino-4-hydroksymetylo-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina 2-amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline	4-CH_2OH-8-MeIQx		243,3	b.d. nda	b.d. nda	1994
2-amino-1,7-dimetyloimidazo[4,5-g]chinoksalina 2-amino-1,7-dimethyl-imidazo[4,5-g]-quinoxaline	7-MeIgQx		213,3	b.d. nda	b.d. nda	1994
2-amino-1,7,9-trimetyloimidazo[4,5-g] chinoksalina 2-amino-1,7,9-trimethyl-imidazo[4,5-g]-quinoxaline	7,9-DiMeIgQx		223,3	b.d. nda	b.d. nda	1994
2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-b]pirydyna 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine	PhIP		224,3	327 - 328	5,6	1986
2-amino-1-metylo-6-(4'-hydroksyfenylo)-imidazo[4,5-b]pirydyna 2-amino-1-methyl-6-(4_-hydroxyphenyl)-imidazo[4,5-b]-pyridine	4'-OH-PhIP		240,3	b.d. nda	b.d. nda	1992
2-amino-1,6-dimetyloimidazo[4,5-b]pirydyna 2-amino-1,6-dimethylimidazo[4,5-b]-pyridine	DMIP		162,2	b.d. nda	b.d. nda	1986

2-amino-1,5,6-trimetyloimidazo[4,5-b]pirydyna 2-amino-1,5,6-trimethylimidazo[4,5-b]-pyridine	1,5,6-TMIP		176,2	b.d. nda	b.d. nda	1986
2-amino-3,5,6-trimetyloimidazo[4,5-b]pirydyna 2-amino-3,5,6-trimethylimidazo[4,5-b]-pyridine	3,5,6-TMIP		176,2	b.d. nda	b.d. nda	1986
2-amino-1,6-dimetylo-furo-[3,2-e]imidazo [4,5-b]pirydyna 2-amino-1,6-dimethyl-furo[3,2-e]imidazo[4,5-b]-pyridine	IFP		202,3	b.d. nda	b.d. nda	b.d. nda
Aminy niepolarne Non-polar amines						
2-amino-9H-pirydo [2,3-b]indol 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole	AαC		183,2	202	4,4	1978
2-amino-3-metylo-9H-pirydo[2,3-b]indol 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole	MeAαC		197,2	215 - 228	b.d. nda	1978
1-metylo-9H-pirydo[3,4-b]indol 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole	harman		182,3	237 - 238	b.d. nda	1978
9H-pirydo[3,4-b]indol 9H-pyrido[3,4-b]indole	norharman		168,2	237 - 238	6,8	1978

2-amino-5-fenolopirydyna 2-amino-5-phenylpyridine	Phe-P-1		170,2	b.d. nda	b.d. nda	1981
3-amino-1,4-dimetylo-5H-pirydo[4,3-b]indol 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]- indole	Trp-P-1		211,3	252 - 262	8,6	1977
3-amino-1-metylo-5H-pirydo[4,3-b]indol 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	Trp-P-2		197,4	248 - 250	6,8	1977
2-amino-6-metylopirydo[1,2- α:3',2'-d]imidazol 2-amino-6-methyldipyrido-[1,2- α:3_,2_-d]imidazole	Glu-P-1		198,3	290 - 292	6,0	1978
2-aminopirydo[1,2- α:3',2'- d]imidazol 2-aminodipyrido-[1,2- α:3_,2_-d]imidazol	Glu-P-2		184,3	286 - 287	5,9	1978
3,4-cyklopentenopyrido[3,2- a]karbazol 3,4-cyclopenteno-pyrido[3,2-a]carbazole	Lys-P-1		246,3	b.d. nda	b.d. nda	b.d. nda

4-amino-6-metylo-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranten 4-amino-6-methyl-1H-2,5,10,10btetraazafluoranthene	Orn-P-1		237,3	b.d. nda	b.d. nda	1981
4-Amino-1,6-dimetylo-2-metyloamino-1H,6H-pirolo[3,4-f]benzimidazolo-5,7-dion 4-amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrrolo-[3,4-f]benzimidazole-5,7-dione	Cre-P-1		244,3	b.d. nda	b.d. nda	1991

b.d. – brak danych / nda – no data available

Z kolei niepolarne heterocykliczne aminy aromatyczne to piroindole i piroimidazole (tzw. grupa „nie-IQ"). Związki te, podobnie jak aminy polarne, tworzą się w żywności podczas obróbki termicznej, jednak dopiero powyżej 300 ºC – z tego powodu są nazywane aminami pirolitycznymi. Charakterystyczną częścią budowy amin niepolarnych (z wyjątkiem harmanu i norharmanu) jest egzocykliczna grupa aminowa i czasem również egzocykliczna grupa metylowa przyłączona do pierścienia pirydynowego połączonego z fragmentem indolu lub imidazolu [21].

Występowanie i powstawanie HCA w produktach mięsnych

Obecność HCA stwierdza się głównie w przetworzonych termicznie produktach białkowych pochodzenia zwierzęcego, m.in. w mięsie wieprzowym, wołowym, drobiowym, baranim oraz w rybach [11, 16, 30, 41]. Wykryto je również w wędzonym włoskim serze [33], produktach sojowych [52] i w kostkach rosołowych [22]. Zawartość HCA w wymienionych produktach nie jest stała i w zależności od warunków może zmieniać się nawet 100-krotnie [56]. Parametrem mającym największy wpływ na ich powstawanie jest temperatura obróbki termicznej. Związki kancerogenne zaczynają się bowiem tworzyć już podczas pierwszych 5 - 10 min termicznej obróbki w temp. 100 ÷ 300 ºC, z surowców zawierających odpowiednie prekursory [48]. Ważną rolę odgrywa metoda obróbki i rodzaj mięsa. Stwierdzono, że najwięcej HCA tworzy się podczas grillowania lub smażenia, zwłaszcza mięsa czerwonego. W większości prac traktujących o wpływie pieczenia i grillowania na poziom HCA, stężenie MeIQx wynosiło poniżej 4 ng/g, a poziom PhIP był niższy od 40 ng/g. Bardzo dużą zawartość MeIQx, około 100 ng/g, oznaczono w mięsie z piersi kurczęcia opiekanego przez 6 min bezpośrednio nad ogniem [18]. W pracach zajmujących się tym rodzajem obróbki termicznej mięsa odnotowano również bardzo duże stężenia PhIP. Przykładem może być pieczone na ruszcie mięso z kurczęcia, w którym PhIP było 480 ng/g (w temp. 177 ÷ 260 ºC) [44] oraz 330 ng/g (w temp. 339 ÷ 365 ºC) [42]. Należy podkreślić, że temperatura powyżej 300 ºC powoduje tworzenie się pirolitycznych HCA. W mięsie kurczęcia grillowanym w 350 ºC zidentyfikowano duże, bo wynoszące 170 ng/g, stężenie AαC [28]. Dodatkowo takie czynniki, jak: obecność katalizatorów i inhibitorów reakcji tworzenia poszczególnych HCA, zawartość tłuszczu, przeciwutleniaczy, aktywność wody i pH wpływają na poziom omawianych związków w żywności [21, 50].

Duszenie i gotowanie w wodzie czy też ogrzewanie z wykorzystaniem techniki mikrofalowej odbywa się zwykle w temperaturze nieprzekraczającej 100 ºC. W tej temperaturze tworzenie HCA jest niewielkie, a ich stężenie zazwyczaj nie przekracza limitu detekcji [51]. Tym niemniej dane literaturowe wskazują na występowanie Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC oraz harmanu i norharmanu w udkach z kurcząt przyrządzonych w kuchence mikrofalowej [10], a także tych dwóch ostatnich związków na

poziomie 0,5 ng/g w gotowanym mięsie z kurcząt i bulionie pochodzącym z tego mięsa.

Wraz ze wzrostem temperatury obróbki zwiększa się szybkość powstawania heterocyklicznych amin aromatycznych [55]. W zakresie temperatur 100 ÷ 200 ºC (np. głębokie smażenie, pieczenie) powstają śladowe ilości HCA, głównie MeIQx, 4,8-DiMeIQx oraz PhIP, a także harman i norharman w ilościach poniżej 1 ng/g [51]. Chiu i wsp. [10] zidentyfikowali 12 różnych kancerogennych amin w smażonych w głębokim tłuszczu udkach z kurcząt, jednak ich stężenia były niewielkie i utrzymywały się w granicach 1 - 3 ng/g.

Podczas płytkiego smażenia surowców mięsnych na patelni temperatura waha się od około 150 do 250 ºC. W filecie z kurczęcia przygotowywanym tym sposobem oznaczono większość tych samych HCA, które powstawały już podczas obróbki w niższych temperaturach, a ich stężenia były podobne [9, 42]. Jak na omawiane warunki obróbki termicznej, stwierdzono wyjątkowo duże stężenie MeIQx w filecie z kurczęcia smażonym 15 min w temp. 220 ºC – wynosiło ono 10,4 ng/g [29]. Z innych danych literaturowych wynika, że spośród amin tworzących się podczas płytkiego smażenia, stężenie PhIP jest największe [44, 46, 51]. Przykładem może być analiza filetu z kurczęcia, w którym zawartość PhIP wynosiła około 30 ng/g (po obróbce w 190 ºC) i 38 ng/g (po obróbce w 220 ºC) [51]. Duże stężenie tej aminy, wynoszące 64,9 ng/g, oznaczono również w smażonym na patelni w 190 ºC filecie z indyka [9]. Powyższe dane wskazują na rosnącą tendencję do powstawania wymienionych amin wraz ze zwiększaniem się temperatury i czasu obróbki termicznej. Obserwacje te potwierdza również analiza zawartości amin w filetach z kurczęcia smażonych do trzech różnych stopni wysmażenia: pierwszy – *Just until done*, drugi – *Well done* oraz trzeci – *Very well done* [44]. Wzrost zawartości kancerogennych związków można szczególnie zauważyć na przykładzie PhIP, którego koncentracja zwiększa się od 12 ng/g do 70 ng/g przy zmianie stopnia wysmażenia z pierwszego na trzeci. Interesujące okazało się porównanie poddanych identycznej obróbce termicznej (smażeniu w temp. 204 ºC) różnych rodzajów surowców mięsnych (wołowiny, wieprzowiny i mięsa drobiowego) w aspekcie generowania się w nich HCA [39]. Wystąpiły wyraźne różnice pomiędzy całkowitą zawartością tych związków w produktach. W smażonej wieprzowinie ich poziom był znacznie wyższy niż w pozostałych produktach. Badania te zostały potwierdzone przez Skoga i wsp. [47], według których łączne stężenie kancerogennych amin w smażonej w 225 ºC wieprzowinie było ponad dwukrotnie większe niż w identycznie przygotowanym mięsie drobiowym [47].

Oprócz mięsa zwierząt stałocieplnych popularne jest także grillowanie ryb. Analiza jakościowa przygotowanych w ten sposób sardynek i łososia atlantyckiego również wykazała tworzenie się HCA [11]. Grupę amin pirolitycznych zidentyfikowano i oznaczono w sardynkach z rusztu opiekanych w temp. 180 ÷ 200 ºC. Wśród tych

związków najwięcej było AαC i MeAαC (odpowiednio: 17,7 i 10,6 ng/g). Z kolei grillowane w tych samych warunkach mięso łososia charakteryzowało się obecnością Glu-P-1, MeIQx, PhIP, AαC oraz MeAαC, wśród których najwięcej było Glu-P-1 i PhIP (odpowiednio: 13,18 i 13,0 ng/g). Wpływ marynaty oraz obecności skóry na powstawanie HCA w mięsie łososia badali Iwasaki i wsp. [20]. Mięso to analizowano w dwóch wariantach: ze skórą i bez, dodatkowo każdy z wariantów został podzielony na próbki z marynatą i bez jej dodatku, które kolejno usmażono na patelni do trzech różnych stopni wysmażenia (*medium* – temp. wew. 70 ºC, *well-done*– temp. wew. 80 ºC, *very well-done* – temp. wew. 90 ºC) i poddano grillowaniu (tylko próbki bez marynaty). Otrzymane wyniki po raz kolejny dowodzą wpływu temperatury obróbki termicznej na ilość tworzących się HCA. Całkowite stężenie analitów w próbkach poddawanych grillowaniu było około 4,5-krotnie wyższe od oznaczonego w próbkach smażonych na patelni. Wzrost zawartości amin można także zauważyć analizując stopnie wysmażenia mięsa, zakres ten zmieniał się od stężeń poniżej granicy detekcji w przypadku próbek przyrządzanych w najniższej temperaturze do prawie 30 ng/g przy smażeniu *very well-done*. Niewielkie różnice zawartości analizowanych związków występowały natomiast pomiędzy próbkami poddanymi marynowaniu i bez marynowania oraz między próbkami mięsa ze skórą i bez niej.

W tab. 2. przedstawiono wyniki oznaczeń najczęściej występujących HCA w produktach mięsnych poddawanych różnym rodzajom obróbki cieplnej. Stężenia wymienionych w niej amin (MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP, IQ, harman, norharman) są przeważnie większe od stężeń pozostałych HCA powstających w żywności.

Poza analizą HCA w przetworzonych termicznie produktach mięsnych prowadzono również identyfikację tych związków w tłuszczu oraz w bulionie, powstających podczas określonych rodzajów obróbki cieplnej. W tłuszczu pozostałym po smażeniu w temp. 225 ºC wykazano sumaryczną ilość HCA (MeIQx, DiMeIQx i PhIP) na poziomie zbliżonym do limitów detekcji, natomiast największą sumaryczną zawartość powyższych analitów oznaczono w pozostałości po smażeniu mięsa wieprzowego – 41,8 ng/g [47]. W bulionach drobiowych nie stwierdzono występowania amin powyżej poziomów detekcji z wyjątkiem harmanu i norharmanu, których stężenia wynosiły odpowiednio: 8,4 i 8,0 ng/g [51].

Świadomość zagrożeń wynikających z wysokotemperaturowego przygotowywania potraw spowodowała, że podjęto badania nad sposobami inhibicji tworzenia się amin. Uwzględniając mechanizmy powstawania tych związków, do zahamowania ich syntezy zaproponowano zastosowanie przeciwutleniaczy syntetycznych, takich jak: butylohydroksyanizol – BHA, butylohydroksytoluen – BHT, galusan propylu – PG i naturalnych, jak: flowonoidy, witamina E i C oraz produkty roślinne o dużej zawartości tych ostatnich [7, 13, 23, 37, 40, 41, 42]. Otrzymane wyniki nie pozwoliły jednoznacznie określić hamującego wpływu przeciwutleniaczy syntetycznych na powstawa-

nie heterocyklicznych amin aromatycznych. O ile w układzie modelowym, zastosowanym przez Kato i wsp. [27], zaobserwowano zmniejszenie stężenia amin z grupy imidazochinoksalin pod wpływem BHA i PG, to Johansson i wsp. [26] stwierdzili znaczny wzrost zawartości MeIQx, IQx oaz 7,8-DiMeIQx w ich obecności. Zadowalające wyniki otrzymano po zastosowaniu przeciwutleniaczy naturalnych oraz produktów pochodzenia roślinnego zawierających przeciwutleniacze. Przykładem mogą być badania Ogumiego i wsp. [36] z 14 różnymi związkami o właściwościach przeciwutleniających. Spośród przetestowanych przez nich substancji katechiny, flawonoidy (luteolina i kwercetyna) oraz kwas kawowy powodowały redukcję stężeń wybranych HCA nawet o 97 %.

Tabela 2. Zawartość wybranych heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA) w produktach mięsnych poddawanych obróbce termicznej [ng/g ś.m.]
Table 2. Content of selected heterocyclic aromatic amines (HCAs) in thermally processed meat products [ng/g f.m.]

Rodzaj obróbki/Próbka Method of processing/Sample	Temp. [°C]	Czas Time [min]	MeIQ	4,8-DiMeIQx	PhIP	IQ	Harman	Norharman	Źródło Source
Mikrofalowanie / Microwaving									
Bekon Bacon	-	3	<0,2	<0,2	<0,2 do 3,1	<0,2	nd	3,3	[15] [45]
Gotowanie / Cooking									
Pierś z kurczęcia Chicken breast	100	23	-	-	n.d.	-	0,1	nd	[18]
Głębokie smażenie / Deep-frying									
Udko z kurczęcia Chicken legs	100 ÷ 200	5 ÷ 15	nd-0,51*	nd-0,78*	nd-2,81*	0,09 - 0,51*	nd - 2,11*	nd - 1,31*	[10]
Pierś z kurczęcia Chicken breast	160	11	-	śladowe traces	śladowe traces	-	0,5	0,3	[51]
Smażenie na patelni / Pan-frying									
Stek wołowy Beef steak	190 ÷ 230	10 ÷ 15	-	-	nd-1,09	-	0,15 ÷ 0,83	0,50 ÷ 2,60	[2]
Stek wołowy Beef steak	180 ÷ 210	4	nd	1,27	6,99	nd	5,9	21,2	[53]
Pierś z indyka Turkey breast	190	12	4,4	-	nd	-	12,0	16,5	[9]

c.d. Tab. 2.

Kiełbasa wieprzowa Pork sausage	160	6	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-	[25]
Pieczenie w piekarniku / Oven-broiling									
Wołowina Beef	175 ÷ 185	4 ÷ 24	-	-	-	-	4,03	5,0	[54]
Polędwica wołowa Beef sirloin	200	40	nq	0,36	1,04	nq	-	-	[15]
Grillowanie / Grilling									
Bekon Bacon	230	15	-	0,94	4,97	0,42	-	-	[17]
Kiełbasa wieprzowa Pork sausage	200 ÷ 240	7 ÷ 12	-	-	-	-	0,10 ÷ 1,16	0,57 ÷ 4,20	[2]
Kotlet schabowy Pork chop	15	190 ÷ 200	1,8	7,5	2,1	1,1	-	-	[57]
Stek barani Mutton steak	11	175 ÷ 200	<0,04	1,8	5,8	<0,04	7,2	9,1	[8]

nd – niewykrywalne / non-detectable; nq – wykryty, ale poniżej loq/ detected, but below loq

Identyfikacja i oznaczanie wybranych HCA w produktach spożywczych

Pierwsze prace dotyczące ilościowej analizy HCA w produktach mięsnych i rybach, najczęściej wykonywane technikami chromatograficznymi, pochodzą z lat 80. XX w. Wcześniejsze informacje na ten temat dotyczą głównie aktywności mutagennej wynikającej z testu Amesa [3]. Wykonanie oznaczenia HCA jest trudne z uwagi na skomplikowaną matrycę biologiczną, jaką stanowi żywność, niewielkie stężenia HCA oraz konieczność wykonywania wieloetapowej ekstrakcji omawianych związków. Opracowuje się więc nowe lub modyfikuje już istniejące metody izolacji, oczyszczania i analizy HCA w produktach spożywczych. Nadal powszechną techniką oznaczania omawianych związków chemicznych w żywności jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z detekcją UV, fluorescencyjną, DAD (ang. *Diode Array Detector*), elektrochemiczną lub w połączeniu ze spektrometrią masową (MS), a także chromatografia gazowa (GC) sprzężona z detektorem MS. Wykonano również prace, w których do analizy HCA zastosowano elektroforezę kapilarną (CE), a także metody immunoenzymatyczne (np. ELISA) [5, 38].

Pierwszym etapem analizy HCA w żywności jest oczyszczenie, a następnie izolacja analitów. Zwykle niezbędne jest wytrącenie białek podczas homogenizacji np. z metanolem albo dichlorometanem lub poprzez regulację pH. Można je również zhy-

drolizować, wykorzystując do tego celu preparaty enzymów proteolitycznych [12, 38]. Pierwszą ekstrakcję przeprowadza się w układzie ciecz – ciecz z wykorzystaniem jako ekstrahenta dichlorometanu, eteru etylowego lub octanu etylu. Ekstrakcję ciecz – ciało stałe można przeprowadzić przy użyciu żywicy XAD-2 (kopolimer styrenu i diwinylobenzenu) albo wykorzystując do tego celu włókna bawełniane lub ze sztucznego jedwabiu [43]. Zwyczajowo stosuje się jednak procedurę zaproponowaną przez Grossa i Grütera [14], wykorzystującą kolumienki wypełnione ziemią okrzemkową, a dalsze oczyszczanie prowadzi się w kolumienkach z kwasem propylosulfonowym (PRS), krzemionką (C18) lub wymiennikami jonowymi (SCX). Metoda ta jest najczęściej wybierana do izolacji HCA z żywności. Stosuje się również bardziej zaawansowane metody izolacji, np. połączenie ekstrakcji wspomaganej mikrofalami z mikroekstrakcją ciecz – ciecz [31], jednak technika ta wymaga specjalistycznej aparatury i jest droga.

Najbardziej popularną techniką analizy jakościowej i ilościowej jest wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją spektrofotometryczną i fluorescencyjną [5, 24, 28, 38]. Przykładem wykorzystania układu HPLC-DAD do oznaczania sześciu związków z grupy polarnych HCA (DMIP, IQ, 8-MeIQx, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP) w mięsie jest praca Janoszki i wsp. [24]. Analizie poddano mięso wieprzowe usmażone na patelni bez dodatku tłuszczu w temp. 170 ºC, do którego dodano następnie wodę i duszono w temp. 95 ÷ 98 ºC. Sprawdzono też zawartość amin w pozostałości po przygotowywanym mięsie. Do ekstrakcji analitów zastosowano zmodyfikowaną metodę Grossa i Grütera, a separację prowadzono za pomocą kolumny TSK-gel ODS 80-T_M, używając jako eluenta mieszaniny buforu fosforanowego o pH 3,3 z dodatkiem trietyloaminy oraz acetonitrylu. Chromatogramy rejestrowano przy wybranych długościach fal: 227, 253, 263 i 321 nm. Wyznaczone limity wykrywalności aminoazarenów wynosiły od 0,4 do 4 ng/g, natomiast wynik oznaczania wszystkich HCA w mięsie i powstałym podczas przygotowywania sosie wynosił odpowiednio: 18,00 i 15,08 ng/g.

Chromatografię cieczową sprzężoną z detektorem mas zastosowano z kolei do rozdzielenia i analizy wybranych HCA (AαC, MeAαC, PhIP, harman i norharman) wyekstrahowanych ze skóry różnych mięs grillowanych przez duńskich konsumentów w warunkach domowych [1]. Anality wyizolowane z próbek za pomocą włókna szklanego rozdzielono w kolumnie SB-Phenyl układu LC-MS/MS. Do separacji oznaczanych związków użyto mieszaniny octanu amonu i acetonitrylu w przepływie gradientowym. W wyniku przeprowadzonej analizy oznaczono tylko PhIP, harman i norharman, natomiast stężenia AαC i MeAαC były poniżej granic wykrywalności.

W niniejszej pracy przedstawiono tylko przykładowe techniki analityczne, z których proponowana przez Janoszkę i wsp. [24] jest obecnie najczęściej stosowana w badaniach naukowych.

Podsumowanie

Produkty mięsne stanowią istotny składnik diety człowieka. Oprócz oczywistych walorów smakowo-odżywczych, jakie wiążą się z konsumpcją mięsa, może ono stanowić źródło wielu potencjalnych zagrożeń, w tym także o charakterze mutagennym i kancerogennym. Heterocykliczne aminy aromatyczne zaliczyć można do związków o takim działaniu, w związku z tym celowe jest zgłębianie wiedzy nad wpływem obróbki termicznej na ich zawartość. Dotychczasowe badania pozwoliły stwierdzić, że w standardowo przyrządzanych produktach mięsnych stężenie heterocyklicznych amin aromatycznych mieści się w zakresie 1 ÷ 500 ng/g, lecz z reguły nie przekracza 100 ng/g [34]. Zawartość tych szkodliwych związków jest bardzo niewielka w produktach powstających podczas niskotemperaturowej obróbki termicznej, a zwiększa się ze wzrostem temperatury przygotowywania posiłków.

Niniejsza praca powstała w ramach dotacji celowej na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich finansowanych w trybie konkursowym Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie

Literatura

[1] Aaslyng M.D., Duedahl-Olesen L., Jensen K., Meinert L.: Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef and chicken barbecued at home by Danish consumers. Meat Sci., 2013, **93 (1)**, 85-91.

[2] Abdulkarim B.G., Smith J.S.: Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. J. Agric. Food Chem., 1998, **46 (11)**, 4680-4687.

[3] Ames B., Lee J., Durston W.: An Improved Bacterial Test System for the detection. Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, **70 (3)**, 782-786.

[4] American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research (eds.). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective American Institute for Cancer Research, Washington, DC 1997.

[5] Alaejos S.M., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.: Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. J. Chromatogr. B, 2008, **862 (1-2)**,15-42.

[6] Alaejos M.S., Afonso A.M.: Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. Compr. Rev. Food Sci. F, 2011, **10 (2)**, 52-108.

[7] Balgoh Z., Gray J.I., Gomaa E.A., Booren A.M.: Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. Food Chem. Toxicol., 2000, **38 (5)**, 395-401.

[8] Busquets R., Bordas M., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., Borgen E., Skog K.: Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diets. J Chromatogr. B, 2004, **802 (1)**, 79-86.

[9] Brockstedt U., Pfau W.: Formation of 2-amino–carbolines in pan-fried poultry and 32P-postlabelling analysis of DNA adducts. Z. Lebensm.,- Unters.,- Forsch. A, 1998, **207 (6)**, 472-476.

[10] Chiu C.P., Yang D.Y., Chen B.H.: Formation of heterocyclic amines in cooked chicken legs. J. Food Protect., 1998, **61 (6)**, 712-719.

[11] Costa M., Viegas O., Melo A., Petisca C., Pinho O.: Ferreira I.: Heterocyclic aromatic amine formation in barbecued Sardines (*Sardina pilchardus*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*). J. Agric. Food Chem., 2009, **57 (8)**, 3173-3179.

[12] Felton J.S., Knize M.G., Wood C., Wuebbles B.J., Healy S.K., Stuermer D.H., Bjeldanes L.F., Kimble B.J., Hatch F.T.: Isolation and characterization of new mutagens from fried ground beef. Carcinogenesis, 1984, **5 (1)**,95-102.

[13] Gibis M.: Effect of oil marinades with garlic, onion, and lemon juice on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried beef patties. J. Agric. Food Chem., 2007, **55 (25)**, 10240-10247.

[14] Gross G.A., Gruter A.: Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. J. Chromatogr, 1992, **592 (1-2)**, 271-278.

[15] Gross G.A., Turesky R.J., Fay L.B., Stillwell W.G., Skipper P.L., Tannenbaum S.R.: Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish, and in grill scrapings. Carcinogenesis, 1993, **14 (11)**, 2313-2318.

[16] Guo H., Pan H., Wang Z., Chen L., Zhang D.: Simultaneous determination of nine heterocyclic aromatic amines in mutton products by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. Se Pu (Chinese J. Chromatogr.), 2012, **30 (10)**, 1074-1080.

[17] Guy P.A, Gremaud E., Richoz J., Turesky R.J.: Quantitative analysis of heterocyclic aromatic amines in cooked meat using liquid-chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr., 2000, **883 (1-2)**, 89-102.

[18] Holder C.L., Preece S.W., Conway S.C., Pu Y.M., Doerge D.R.: Quantification of heterocyclic amine carcinogens in cooked meats using isotope dilution liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1997, **11 (5)**, 1667-1672.

[19] IARC, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins. IARC. 1993, **56**, 165-242.

[20] Iwasaki M., Kataoka H.., Ishihara J., Takachi R., Hamada G.S., Sharma S., Le Marchand L., Tsugane S.: Heterocyclic amines content of meat and fish cooked by Brazilian methods. J. Food Compos. Anal., 2010, **23 (1)**, 61-69.

[21] Jägerstad M., Skog K., Arvidsson P., Solyakov A.: Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. Z. Lebensm.- Unters.- Forsch. 1998, **207 (6)**, 419-427.

[22] Janoszka B.: Heterocyclic aromatic amines (HAA) in food: Content of aminoazaarenes in protein-rich food and estimated human exposure to those compounds. Bromat. Chem. Toxycol., 2006, **39 (4)**, 345-352.

[23] Janoszka, B.: Heterocykliczne aromatyczne aminy w żywności: wpływ antyoksydantów i dodatków pochodzenia roślinnego na stężenie aminoazaarenów w żywności wysokobiałkowej. Bromat. Chem. Toxycol., 2006, **39 (4)**, 353-360.

[24] Janoszka B., Błaszczyk U., Damasiewicz-Bodzek A., Sajewicz M.: Analysis of heterocyclic amines (HAs) in pan-fried pork meat and its gravy by liquid chromatography with diode array detection. Food Chem., 2009, **113 (4)**, 1188-1196.

[25] Johansson M.A.E., Jägerstad M.: Occurrence of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in meat and fish products, including pan residues, prepared under domestic conditions. Carcinogenesis, 1994, **15 (8)**, 1511-1518.

[26] Johansson M.A.E., Jägerstad M.: Influence of pro- and antioxidants on the formation of mutagenic-carcinogenic heterocyclic amines in a model system. Food Chem.,1996, **56 (1)**, 69-75.

[27] Kato T., Harashima T., Moriya N., Kikugawa K., Hiramoto K.: Formation of the mutagenic/carcinogenic imidazoquinoxaline - type heterocyclic amines through the unstable free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidants. Carcinogenesis, 1996, **17 (11)**, 2469-2476.

[28] Knize M.G., Salmon C.P., Hopmans E.C., Felton J.S.: Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 1997, **763 (1-2)**, 179-185.

[29] Krul C., Luiten-Schuite A., Baandagger R., Verhagen H., Mohn G., Feron V., Havenaar R.: Application of a dynamic in vitro gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. Food Chem. Toxicol., 2000, **38 (9)**, 783-792.

[30] Liao G.Z., Wang G.Y., Xu X.L., Zhou G.H.: Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. Meat Sci., 2010, **85 (1)**,149-154.

[31] Mesa L.B.A., Padro J.M., Reta M.: Analysis of non-polar heterocyclic aromatic amines in beef burgers by using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-ionic liquid microextraction. Food Chem., 2013, **141 (3)**, 1694-1701.

[32] Murkovic M.: Analysis of heterocyclic aromatic amines. Anal. Bioanal. Chem., 2007, **389 (1)**, 139-146.

[33] Naccari C., Galceran M.T., Moyano E., Cristani M., Siracusa L., Trombetta D.: Presence of heterocyclic aromatic amines (HAs) in smoked ''Provola" cheese from Calabria (Italy). Food Chem. Toxicol., 2009, **47 (2)**, 321-327.

[34] Nowak A., Libudzisz Z.: Karcynogeny w przewodzie pokarmowym człowieka. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2008, **4 (59)**, 9-25.

[35] NTP Report on Carcinogens. Selected heterocyclic amines. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Natl. Toxicology Program. Eleventh Edition, 2004, pp. 135-138.

[36] Oguri A., Suda M., Totsuka Y., Sugimura T., Wakabayashi K.: Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. Mutat. Res-Fund. Mol M, 1998, **402 (1-2)**, 237-245.

[37] Oz F., Kaya M.: The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball. Food Control., 2011, **22 (3-4)**, 596-600.

[38] Pais P., Knize M.G.: Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. J. Chromatogr. B, 2000, **747 (1-2)**, 139-69.

[39] Puangsombat K., Gadgil P., Houser T.A., Hunt M.C., Smith J.S.: Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products. Meat Sci., 2012, **90 (3)**, 739-746.

[40] Quelhas I., Petisca C., Viegas O., Melo A., Pinho O., Ferreira I.: Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. Food Chem., 2010, **122 (1)**, 98-104.

[41] Ruan E.D., Juárez M., Thacker R., Yang X., Dugan M.E., Aalhus J.L.: Dietary vitamin E effects on the formation of heterocyclic amines in grilled lean beef. Meat Sci., 2014, **96 (2)**, 849–853.

[42] Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S.: Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. Food Chem. Toxicol., 1997, **35 (2)**, 433-441.

[43] Schwarzenbach R., Gubler D.: Detection of heterocyclic aromatic amines in food flavours. J. Chromatogr., 1992, **624 (1-2)**, 491-495.

[44] Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Salmon C.P., Knize M.G., Swanson C.A., Rossi S.C., Mark, S.D., Levander O.A., Felton J.S.: High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. Cancer Res., 1995, **55 (20)**, 4516-4519.

[45] Sinha R., Knize M.G., Salmon C.P., Brown E.D., Rhodes D., Felton J.S., Levander O.A., Rothman N.: Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. Food Chem. Toxicol., 1998, **36 (4)**, 289-297.
[46] Sinha R., Rothman N.: Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. Cancer Lett., 1999, **143 (2)**, 189-194.
[47] Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., Jägerstad M.: Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. Food Chem. Toxicol., 1997, **35 (6)**, 555-565.
[48] Skog K.I., Johansson M.A.E., Jägerstad M.I.: Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. Food Chem. Toxicol., 1998, **36 (9-10)**, 879-896.
[49] Skog K., Solyakov A.: Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. Food Chem. Toxicol., 2002, **40 (8)**, 1213-1221.
[50] Skog K., Eneroth A., Svanberg M.: Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. Int. J. Food Sci. Techn., 2003, **38 (3)**, 313-323.
[51] Solyakov A., Skog K.: Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways. Food Chem. Toxicol., 2002, **40 (8)**, 1205-1211.
[52] Thiébaud H.P., Knize M.G., Kuzmicky P.A., Hsieh D.P., Felton J.S.: Airborne mutagens produced by frying beef, pork and a soy-based food. Food Chem. Toxicol., 1995, **33 (10)**, 821-828.
[53] Toribio F., Busquets R., Puignou L., Galceran M.T.: Heterocyclic amines in griddled beef steak analyzed using a single extract clean-up procedure. Food Chem. Toxicol., 2007, **45 (4)**, 667-675.
[54] Totsuka Y., Ushiyama H., Ishihara J., Sinha R., Goto S., Sugimura T., Wakabayashi K.: Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. Cancer Lett., 1999, **143 (2)**, 139-143.
[55] Turesky R..J, Taylor J., Schanackenberg L., Freeman J.P., Holland R.D.: Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. J. Agric. Food Chem., 2005, **53 (8)**, 3248-3258.
[56] Turesky R.J.: Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. Toxicol. Lett., 2007, **168 (3)**, 219-227.
[57] Warzecha L., Janoszka B., Blaszczyk U., Srozyk M., Bodzek D., Dobosz C.: Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes. J. Chromatogr B, 2004, **802 (1)**, 95-106.

HETEROCYCLIC AROMATIC AMINES AS CHEMICAL HAZARD IN THERMALLY PROCESSED MEAT PRODUCTS

S u m m a r y

Some food processing methods can cause many chemical compounds to form in food, including mutagenic and carcinogenic heterocyclic aromatic amines (HAA). Those substances are formed during the thermal treatment of products with a high content of protein, whereby the quantity and the type thereof are mainly dependent on the temperature and, sometimes, on the type of process. The paper presents the general profile of HCAs and classes they are divided into based on their chemical structure and formation conditions. Furthermore, various thermal processing methods of meat were discussed in terms of the formation of heterocyclic aromatic amines and methods to inhibit those formation processes, because there is a correlation between frequent consumption of processed meat and cancer incidences in humans. The last

part of the paper is a review of analytical techniques used to purify and extract samples containing the compounds listed as well as the most popular techniques used to qualitatively and quantitatively analyze them.

Key words: Heterocyclic Aromatic Amines (HAA), thermal processing of food, meat preserves, mutagens, carcinogens